This Page Is Inserted by IFW Operations and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents will not correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.



PCT WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM
INTERNATIONALE ANMELDUNG VEROFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patienthlassifikation 6: C07D 493/04, 417/08, 277/24, A61K 31/425, C07F 7/08, C07D 493/08, A01N 43/78, 43/90 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00) (C07D 493/08, 321:00, 313:00)	Al	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/19086 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Mai 1997 (29 05.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP((22) Internationales Anmeldedatum: 18. Novem		CH. DE, DK, ES, FI. FR. GB, GR. IE. IT. LU, MC, NL, PT. SE).
(30) Prioritätudaten: 195 42 986.9 196 19 456.2 17. November 1995 (17.11.5 196 19 456.2 25. September 1996 (25.09.5 (71) Animolder (Fir alla Besticimangsstataten ausst. GESELLSCHAFT FUR BIOTECHNOLO FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Maschero I, D-38124 Braunschweig (DE).	96) [er <i>U</i> : xgisci	CE
 (72) Erfänder; und (75) Erfänder/Anmelder (nur für US): HÖFLE, Gerhard (Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE) Michael (DE/DE); Mascheroder Weg 1, D-3812 schweig (DE). (74) Anwälze: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bereitsranger 15, D-81541 München (DE). 	A Bau	E. Br-
(54) Title: EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATI	ION A	ND USE
CON BANKS PROTEIN ON DERIVATE HERSTELL	LUNG	UND VERWENDUNG

The invention relates to epothilons derivatives and the use thereof.

(57) Zusemmenfterung

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilonderivase und deren Verwendung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertregenzeiten auf den Kopfrögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffendliches.

M And I Out II And IB Ben IE Ben	centra ce	GB GR	Vereinigen Einigreich Georgieb Geimek	ME NE NL	Niger Nigertands
T Out		GN	Georgian Carinea		Nindadanda
II VA			Coincia		
				NO	Nervegel
		GR	Grindenteed	MB	Name and Address of the Lorentz of t
2 1		WU	Ungam	PL.	Neutricola Poles
		12	irland	PT	
g ⊨	rides, Print	iŦ	traffice.		Portugal Aurabian Researche Poloresian
	-	JP	leptin	RO	A company of the comp
		102	Kanya	20	
	ميائي	2.0	Pinking.	530	Sudan
<u> </u>			Kirjalana Deschmische Volksrepublik Koren Republik Koren Konstieren Lieptenstein	52	Schools
CA T			Secretal Koma	5G	Singaper Shownish Shownish Sanaph Sanaph Sanaph
7 2	and Addressed Republic			93	Standards.
ž	•	ra.	Name of the last o	586	Stonesia
		u		574	Senagel
		LE	Sri Cambo	52	المعانيون إ
a 9	Taranta Taranta	LE	Lásta	10	Tucked
ot 5	-	LE	Libraria.	76	Toge
	Mas .	LU	Learning Learning	TJ	Taring
OS T		LV	ومراعي	π	Trimited and Tobago
CS T	Children .	MC	Manager	ÜA	(Verset)
DE D	clusteria Republik constitut torrett		Republik Maldan		Ugando
DK D	أتعبط	MG	Madegaliti	UG	Verbrige States von Amerika
CE 1		MEL	Mali	US	Unberkinnen.
PR 5	هنده	MOS	Name of the last o	UZ	V
<u> </u>	mind.	ME	Magnetican	V;0	V
m r	instant . Colombia		Madema		
GA C	-	M.M.			

WO 97/19086 PCT/EP96/05080

EPOTHILONDERIVATE, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Epothilonderivate und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der Epothilonderivate der nachfolgend dargestellten allgemeinen Formeln 1 bis 7 sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.

4

7

In den vorstehenden Formeln 1 bis Formel 7 bedeuten:

R = H, C₁₋₄-Alkyl; R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, C₁₋₆-Alkyl, C₁₋₆-Acyl-Benzoyl, C₁₋₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁₋₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl;

wobei auch zwei der Reste R^1 bis R^5 zu der Gruppierung - $(CH_2)_n$ -mit n=1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt;

Y und Z sind entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Wasserstoff, Halogen, wie F, Cl. Br oder J, Pseudohalogen, wie -NCO, -NCS oder -N3, OH, O- (C_{1-6}) -Acyl, O- (C_{1-6}) -Alkyl, O-Benzoyl. Y und Z können auch das O-Atom eines Epoxides sein, wobei Epothilon A und B nicht beansprucht werden, oder eine der C-C-Bindungen einer C-C-Doppelbindung bilden.

In der Formel 3 steht X allgemein für -C(0)-, -C(S)-, -S(0)-, $-C(R^2R^2$ -, wobei R^2 und R^2 die Bedeutung haben wie oben angegeben, und $-SiR_2$ -, wobei R die Bedeutung hat wie oben angegeben.

In der Formel 4 bedeutet X Sauerstoff, NOR^3 , $N-NR^4R^5$, und $N-NHCONR^4R^5$, wobei die Reste R^3 bis R^5 die oben angegebene Bedeutung haben.

In der Formel 5 bedeutet X Wasserstoff, C_{1-18} -Alkyl, C_{1-18} -Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl.

Für Epothilon A und B sei verwiesen auf DE-A-41 38 042. Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 1 sind ausgehend von Epothilon A und B sowie von deren 3-0- und/oder 7-0-geschützten Derivaten durch Öffnung des 12,13-Epoxids zugänglich. Werden dazu Hydrogenwasserstoffsäuren in einem bevorzugt nicht wässrigen Lösungsmittel eingesetzt, wobei man die Halogenhydrine X = Hal, Y = OH und Y = OH, Y = Hal erhält. Protonensäuren wie z.B. Toluolsulfonsäure und Trifluoressigsäure führen in Gegenwart von Wasser zu 12,13-Diolen, die anschließend nach Standardverfahren acyliert (z.B. mit Carbonsäureanhydriden und Pyridin oder Triethylamin/DMAP) oder alkyliert (Alkylhalogenide und Silberoxid) werden. Die 3- und 7-Hydroxygruppen können dazu vorübergehend als Formiat (Abspaltung mit NH3/MeOH) oder p-Methoxybenzylether (Abspaltung mit DDQ) geschützt werden.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 2 sind aus Epothilon A und B sowie deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Reduktion, z.B. mit NaBH4 in Methanol erhältlich. Sind dabei 3-OH und/oder 7-OH reversibel geschützt, so können nach Acylierung oder Alkylierung und Entfernen der Schutzgruppen 5-O-monosubstituierte, 3,5- oder 5,7-O-disubstituierte Derivate der allgemeinen Formel 2 erhalten werden.

Umsetzungen von Epothilon A und B mit bifunktionellen elektrophilen Reagenzien, wie (Thio) Phosgen, (Thio) Carbonyldimidazol,
Thionylchlorid oder Dialkylsilyldichloriden bzw. -bistriflaten
ergeben Verbindungen der allgemeinen Formel 3. Als Hilfsbasen
dienen dabei Pyridin, Trialkylamine, ggf. zusammen mit DMAP bzw.
2,6-Lutidin in einem nichtprotischen Lösungsmittel. Die 3,7-Acetale der allgemeinen Formel 3 entstehen durch Umacetalisierung
z.B. von Dimethylacetalen in Gegenwart eines sauren Katalysators.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 4 werden aus Epothilon A und B oder ihren 3-0- und/oder 7-0-geschützten Derivaten durch Ozonolyse und reduktive Aufarbeitung, z.B. mit Dimethylsulfid, erhalten. Die C-16-Ketone können anschließend nach dem Fachmann geläufigen Standardverfahren in Oxime, Hydrazone oder Semicarbazone umgewandelt werden. Sie werden weiterhin durch Wittig-, Wittig-Horner-, Julia- oder Petersen-Olefinierung in C-16/C-17-Olefine überführt.

Durch Reduktion der C-16-Ketogruppe, z.B. mit einem Aluminiumoder Borhydrid, sind die 16-Hydroxyderivate gemäß der allgemeinen Formel 5 erhältlich. Diese können, wenn 3-OH und 7-OH mit
entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert
entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert
oder alkyliert werden. Die Freisetzung der 3-OH- und 7-OH-Gruppen erfolgt z.B. bei O-Formyl durch NH₃/MeOH, bei O-p-Methoxybenzyl durch DDQ.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel 6 werden aus Derivaten von Epothilon A und B erhalten, bei denen die 7-OH-Gruppe durch Acyl- oder Ethergruppen geschützt ist, in dem die 3-OH-Gruppe z.B. formyliert, mesyliert oder tosyliert und anschließend durch Behandlung mit einer Base z.B. DBU eliminiert wird. Die 7-OH-Gruppe kann wie oben beschrieben freigesetzt werden.

Verbindungen der allgemeinen Formel 7 werden aus Epothilon A und B oder deren 3-OH- und 7-OH-geschützten Derivaten durch basische Hydrolyse erhalten, z.B. mit NaOH in MeOH oder MeOH/Wasser. Vorzugsweise werden Verbindungen der allgemeinen Formel 7 aus Epothilon A oder B oder deren 3-OH- oder 7-OH-geschützten Derivaten durch ensymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esteraturch ensymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esteraturch ensymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esteraturch ensymatische Die Carboxylgruppe kann mit Diazoalkanen nach Schutz der 19-OH-Gruppe durch Alkylierung in Ester umgewandelt werden.

WO 97/19086 PCT/EP96/05080

Ferner können Verbindungen der Formel 7 durch Lactonisierung nach den Methoden von Yamaguchi (Trichlorbenzoylchlorid/DMAP), Corey (Aldrithiol/Triphenylphosphin) oder Kellogg (omega-Bromsäure/Caesiumcarbonat) in Verbindung der Formel 2 umgewandelt werden. Einschlägige Arbeitsmethoden finden sich bei

Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; und Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann man auch von Epothilon C oder D ausgehen, wobei zur Derivatisierung auf die vorstehend beschriebenen Derivatisierungsmethoden verwiesen werden kann. Dabei kann man die 12,13-Doppelbindung selektiv hydrieren, beispielsweise katalytisch oder mit Diimin; oder epoxidieren, beispielsweise mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure; oder in die Dihalogenide, Dipseudohalogenide oder Diazide umwandeln.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten zeigen und/oder Immunsuppression bewirken und/oder zur Bekämpfung maligner Tumore eingesetzt werden, wobei sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

Beispiele

Beispiel 1: Verbindung la

20 mg (0.041 mmol) Epothilon A werden in 1 ml Aceton gelöst, mit 50 μ l (0.649 mmol) Trifluoressigsåure versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85: 15).

Ausbeute: 4 mg (19 %) Isomer I 4 mg (19 %) Isomer II

Isomer I

Rg (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 IR (Film): ny -

(vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm-1.

0.46

MS (20/70 eV): π/e (t) = 493 (43 [M-H₂O]⁺), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

Hochauflösung: C26H39O6NS ber.: 493.2498 für [M-H2O]*

gef.: 493.2478

Isomer II

Rf (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.22

IR (Film): ny = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm⁻¹.

MS (20/70 eV): m/e (t) = 493 (21 $[M-H_2O]^+$), 394 (12), 306 (46), 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

Hochauflösung: C26H39O6NS ber.: 493.2498 für [M-H2O]*

gef.: 493.2475

Beispiel 2: Verbindung lb

55 mg (0.111 mmol) Epothilon A werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.8 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 N Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 90 : 10). Ausbeute: 19 mg (32 %)

Rf (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10):

0.46

IR (Film): ny = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm⁻¹.

<u>UV (Methanol):</u> $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/g (%) = 529 (13 [M*]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

Hochauflösung: C₂₆H₄₀O₆ClNS ber.: 529.2265 für [M*], gef.: 529.2280

Beispiel 3: Verbindung 1c

25 mg (0.047 mmol) 12-Chlor-13-hydroxy-epothilon A (1b) werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 29 mg (0.235 mmol) Dimethylaminopyridin, 151 μl (1.081 mmol) Triethylamin und 20 μl (0.517 mmol) 98 %-iger Ameisensäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit Eis/Natriumchlorid abgekühlt. Nach Erreichen von -15 °C werden dem Reaktionsgemisch 40 μl (0.423 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben und 70 Minuten bei -15 °C gerührt. Nachdem ein Dünnschichtchromatogramm keinen vollständigen Umsatz anzeigt, werden dem Reaktionsgemisch weitere 6 mg (0.047 mmol) Dimethylaminopyridin, 7 μl (0.047 mmol) Triethylamin, 2 μl 98 %-ige Ameisensäure (0.047 mmol) und 4 μl (0.047 mmol) %-ige Ameisensäure (0.047 mmol) %-ige Ame

organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10). Ausbeute: 5 mg (18 %)

Rg (Dichlormethan/Aceton. 90 : 10):

0.67

IR (Film): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M*]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

Hochauflösung: C29H40O9NSCl ber.: 613.2112 für [M*] gef.: 613.2131

Beispiel 4: Verbindung 1d

10 mg (0.020 mmol) Epothilon B werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minutan bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Rf (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

Hochauflösung: C27H42O6NSCl ber.: 543.2421 für [M*]

gef.: 543.2405

Beispiel 5: Verbindung 2a

100 mg (0.203 mmol) Epothilon A werden in 4 ml Tetrahydrofuran/1 M Phosphatpuffer pH 7 (1:1) gelöst und solange mit Natriumborhydrid (150 mg = 3.965 mmol) versetzt bis das Edukt laut Dünnschichtchromatogramm vollständig abreagiert ist. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 verdünnt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Kieselchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 95:5 - grad - nach Dichlormethan/Aceton, 85:15).

Ausbeute: (20 %)

R_g (Dichlormethan/Aceton, 75 : 25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734

(vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch),

1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059

(s. Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M $^{+}$]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

Hochauflösung: C26H41O6NS ber.: 495.2655 für [M+]

gef.: 495.2623

Beispiel 6: Verbindung 3a-d (a-d sind Stereoisomere)

100 mg (0.203 mmol) Epothilon werden in 3 ml Pyridin gelöst, mit 50 μ l (0.686 mmol) Thionylchlorid versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes und Trennung der vier Stereoisomeren 3a-d erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Verbindung 3a

Ausbeute: 4 mg (12 %)

R, (Toluci/Methanol, 90 1210) 1 0.50

(a. [Pilm]: Dy 2361 (m. b. Sch), 1742 (vs), 1701 (vs), 1465 (m. Sch), 1389 (m. Sch), 1238 (s. Sch), 1210 (vs. Sch), 1011 (s. Sch), 957 (s. b. Sch), 808 (m. Sch), 768 (s. Sch)

<u>uv (Methanol):</u> lambda_{max} (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M*]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

Hochauflösung: C26H37O7NS2 ber.: 539.2011 für [M*]

Verbindung 3b

Ausbeute: 14 mg (13 %)

Rg (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.44

IR (Film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s),
1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m,
Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076
(w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br,
Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm⁻¹

<u>try (Methanol):</u> lambda_{max} (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 $(27 \text{ [M}^{+}])$, 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

Hochauflösung: C26R37O7N82 ber.: 539.2011 für [M*] gef.: 539.1998

Verbindung 3c

Ausbeute: 4 mg (4 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.18

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M*]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺] gef.: 539.2001

Verbindung 3d

Ausbeute: 1 mg (1 %)

Rg (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M⁺]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

Hochauflösung: C26H37O7NS2 ber.: 539.2011 für [M+] gef.: 539.1997

Seispiel 7:

10 mg (0:020 mol) Epothilon A werden in 2 ml Dichlormethan gelöst, auf -70 c abgekühlt und anschließend 5 Minuten mit Ozon bis zur schwechen Blaufärbung behandelt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid vertionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid vertionsgemisch wird anschließend zur Aufarbeitung wird das setzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und schließlich durch

praparative Schichtchromatographie (Laufmittel Dichlormethan/Acet n/Methan 1, 85 : 10 : 5) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (64 %)

Rg (Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5): 0.61

IR (Film): ny = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 (M*)), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

Hochauflögung: C21H34O7 ber.: 398.2305 für [M*]
gef.: 398.2295

Beispiel &: Verbindung &a

10 mg (0.018 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A werden in 1 ml Dichlormethan gelost, mit 27 µl (0.180 mmol) T.S-Dissableyclo(5.4.0) undec-7-en (DBU) versetzt und 60 Minuten

Pat Saustenessatur Gerührt

200 Aufarbeitung wird das Kenhtionsgemisch mit 1 M Natriumd!

100 Aufarbeitung wird das Kenhtionsgemisch mit 1 M Natriumd!

100 Aufarbeitung wird das Kenhtionsgemisch mit 1 M Natriumd!

100 Aufarbeitung Puffer pM 1 3 versetzt- und die wäßrige Phase

100 Verseinigten organischen

100 Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen,

100 Phasen werden mit gesättigter Natr

Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 4 mg (22 %)

Rf (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3445 (w, br. Sch), 2950 (vs. br. Sch),
1717 (vs. Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch),
1370 (m, SCh), 1267 (s, br. Sch), 1179
(s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m)
cm⁻¹

UV (Methanol): lambdamax (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M*]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

Hochauflösung: C26H37O5NS ber.: 475.2392 für [M*] gef. 475.2384

Beispiel 9: Verbindung 6b

50 mg (0.09% mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A (werden in 1 ml Dichlorethan gelöst, mit 2 ml (0.013 mol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 12 Stunden bei 90 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Die Reinigung des aus zwei Verbindungen bestehenden Rohproduktes erfolgt mitt ls präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).

Ausbeute: 7 mg (15 %)

Substanzcode

Rg (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10):

0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 (M*1), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

Hochauflösung: C27H37O6NS ber.: 503.2342 für [M*]

Beispiel 10: Verbindung 6c

5 mg (0.009 mmol) 3.7-Di-O-acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 150 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH3/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10). Ausbeute: 3 mg (67 %)

Rf (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.55

IR (Film): ny = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641
(m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237
(vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s),
963 (s, Sch), 737 (vs) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambdames (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (*) = 517 (57 [M*]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

Hochauflösung: C28H39O6NS ber.: 517.2498 für [M*]

Beispiel 11: Verbindung 7a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon werden in 0.5 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 85 : 15).

Ausbeute: 11 mg (52 %)

Rf (Dichlormethan/Methanol, 85 : 15): 0.92

IR (Film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch), 1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch), 1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M⁺]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

Hochauflösung: C23H37O4NS ber.: 423.2443 für [M*] gef.: 423.2410

Beispiel 12: Verbindung 7b

5 mg (0.009 mmol) 7-O-Acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 μ l einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH $_3$ /ml Methanol) versetzt und zwei Tage bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (59 %)

Rg (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.63

IR (Film): ny = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm⁻¹

<u>UV (Mechanol):</u> lambda_{max} (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59)

MS $\{20/70 \text{ eV}\}$: m/e (%) = 567 (1 [M⁺]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

Hochauflösung: C29H45OgNS ber.: 567.2866 für [M*]

gef.: 567.2849

Beispiel 13:

50 mg Epothilon A werden in 20 μ l Dimethylsulfoxid angelöst und mit 30 ml Phosphatpuffer (pH 7,1, 30 mM) verdünnt. Nach Zugabe von 5 mg Schweineleberesterase (Fa. Boehringer Mannheim) wird 2 Tage bei 30 °C gerührt. Man säuert mit 2 N HCl auf pH 5 an und extrahiert die Epothilonsäure 7 mit Ethylacetat. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Ausbeute 48 mg (96 %).

Beispiel 14:

48 mg Epothilonsaure 7 werden in 6 ml THP abs. gelöst und unter Rühren mit 40 μ l Triethylamin und 16 μ l 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid versetzt. Nach 15 min wird vom Niederschlag abfiltriert und innerhalb vom 15 min unter schnellem Rühren in eine siedende Lösung vom 20 mg 4-Dimethylaminopyridin in 200 ml Toluol abs. getropft. Nach weiteren 10 min wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand zwischen Ethylacetat/Citratpuffer (pH 4) verteilt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase ergibt nach präparativer HPLC Trennung 15 mg Epothilon λ .

WO 97/19086 - 22 - PCT/EP96/05080

Beispiel 15: Epothilone C und D als Ausgangsverbindungen

- A. Produktionsstamm und Kulturbedingungen entsprechend dem Epothilon Basispatent.
- B. Produktion mit DSM 6773

75 1 Kultur werden wie im Basispatent beschrieben angezogen und zum Animpfen eines Produktionsfermenters mit 700 1 Produktionsmedium aus 0.8 % Stärke, 0.2 % Glukose, 0.2 % Soyamehl, 0.2 % Hefeextrakt, 0.1 % CaCl₂ x 2H₂O, 0.1 % MgSO₄ x 7H₂O, 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7.4 und optional 15 l Adsorberharz Amberlite XAD-16 verwendet. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage bei 30 C, Belüftung mit 2 m³ Luft/h. Ourch Regulierung der Drehzahl wird der pO₂ bei 30 % gehalten.

C. Isolierung

Das Adsorberharz wird mit einem 0.7 m², 100 mesh Prozeßfilter von der Kultur abgetrennt und durch Waschen mit 3 Bettvolumen Wasser/Methanol 2:1 von polaren Begleitstoffen befreit. Durch Elution mit 4 Bettvolumen Methanol wird ein Rohextrakt gewonnen, der i. Vak. bis zum Auftreten der Wasserphase eingedampft wird. Diese wird dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Eindampfen der organischen Phase ergibt 240 g Rohextrakt, der zwischen Methanol und Heptan verteilt wird, um lipophile Begleitstoffe abzutrennen. Aus der Methanolphase werden durch Eindampfen i. Vak. 180 g Raffinat gewonnen, das in drei Portionen über Sephadex LK-20 (Säule 20 x 100 cm, 20 ml/min Methanol) fraktioniert wird. Die Epothilone sind in der mit 240 - 300 min Retentionszeit eluierten Fraktion von insgesamt 72 g enthalten. Zur Trennung der Epothilone wird in drei Portionen an Lichrosorb RP-18 (15 µm, Säule 10 x 40 cm, Laufmittel 180 ml/min

Methanol/Wasser 65:35) chromatographiert. Nach Epothilon A und B werden mit $R_{\rm L}$ = 90-95 min Epothilon C und 100-110 min Epothilon D eluiert und nach Eindampfen i. Vak. in einer Ausbeute von jeweils 0.3 g als farblose Öle gewonnen.

D. Physikalische Eigenschaften

Epothilon C R = HEpothilon D $R = CH_3$

Epothilon C

C26H39NOSS [477]

ESI-MS: (positiv Ionen): 478.5 für [M+H] *

1H und 13C siehe NMR-Tabelle

DC:Rf = 0,82

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:Re - 11,5 min

Saule: Nucleosil 100 C-18 $7\mu m$, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: lml/min

Detection: Diodenarray

Epothilon D

C27H41NOSS [491]

ESI-MS: (positiv Ionen): 492,5 für (M+H)*

1H und 13C siehe NMR-Tabelle

DC:Re . 0,82

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:Rt = 15.3 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 $7\mu\mathrm{m}$, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: lml/min

Detection: Diodenarray

Tabelle: ${}^1H^-$ und ${}^{11}C^-$ NMR Daten von Epothilon C und Epothilon D in [D,]DMSO bei 300 MHz

	Epothile	Epothilon C			Epothilon D			
H-Atom	8	C-Atom	ð	ه	C-Atom	გ		
	(ppm)		(ppm)	(ppm)		(ppm)		
		1	170.3		1	170.1		
2 - Ka	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0		
2 - Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8		
3 - H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2		
3 - OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4		
5 - H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4		
7 - H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5		
7-OH	4.46		35.4	4.46		36.3		
- H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9		
-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9		
- HD	1.40	11	27.6	1.30	11	31.81		
O-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3		
0 - HDo	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3		
1-H&	1.90	14	31.1	1.75	. 14	31.6		
1-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6		
.2-X	5.38**	16	137.3		16	137.2		
3-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2		
4-Ha	2.35	18 '	152.1	2.30	18	152.1		
4-HD	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7		
5-X	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3		
7-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9		
9-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7		
11-K,	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5		
2-H,	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4		
3 - H ₂	1.21	25	18.4	1.19	25.	18.4		
4-H,	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9		
-	0.90			0.91	27	14.1		
25-K,	0.50			1.63		•		
26-X, 27-X,	2.10			2.11	•			

^{., ..} Zuordnung vertauschber

Beispiel 15:

Epothilon A und 12,13-Bisepi-epothilon A aus Epothilon C

50 mg Epothilon A werden in 1.5 ml Aceton gelöst und mit 1.5 ml einer 0.07 molaren Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton versetzt. Nach 6 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und durch präparative HPLC an Kieselgel (Laufmittel: Methyl-tert.butylether/Petrolether/Methanol 33:66:1) getrennt.

Ausbeute:

25 mg Epothilon A, $R_{\rm L}$ = 3.5 min (analyt. HPLC, 7 μ m, Saule 4 x 250 mm, Laufmittel s. o., Fluß 1.5 ml/min)

und

20 mg 12.13-Bisepi-epothilon A, $R_t = 3.7$ min, ESI-MS (pos. Ionen)

m/z = 494 [M+H]*

1H-NMR in [D4] Methanol, ausgewählte Signale: delta = 4.32

(3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H),

3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69

(17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).

12,13-Bisepi-epothilon A R = H

Patentansprüche

1. Epothilonderivat der Formel 1

wobei R = H, C_{1-4} -Alkyl; R^1 , R^2 = H, C_{1-6} -Alkyl, C_{1-6} -Acyl, Benzoyl, C_{1-4} -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6} -Alkoxy-, C_{6} -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und Y und Z entweder gleich oder verschieden sind und jeweils für Wasserstoff, Halogen, Pseudohalogen, OH, O- (C_{1-6}) -Acyl, O- (C_{1-6}) -Alkyl oder O-Benzoyl stehen oder gemeinsam das O-Atom eines Epoxids oder eine der C-C-Bindungen einer C-C-Doppelbindung bilden, wobei Epothilon A und B ausgenomen sind.

2. Epothilonderivat der Formel 2

wobei R = H, C₁₋₄-Alkyl; R¹, R², R³ = H, C₁₋₆-Alkyl, C₁₋₆-Acyl, Benzoyl, C₁₋₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁₋₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

3. Epothilonderivat der Formel 3

wobei R = H, C_{1-4} -Alkyl; R^{1} , R^{2} = H, C_{1-6} -Alkyl, C_{1-6} -Acyl. Benzoyl, C1-4-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C1-6-Alkoxy-, Cg-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X allgemein für -C(0)-, -C(S)-, -S(0)-, -CR¹R²- und -SiR₂- steht, wobei R, R¹ und R² die Bedeutung haben wie oben angegeben und R¹ und R² auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

4. Epothilonderivat der Formel 4

wobei R = H, C_{1-4} -Alkyl; R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , $R^5 = H$, C_{1-6} -Alkyl, C1-6-Acyl, Benzoyl, C1-4-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C1-6-Alkoxy-, Cg-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkylbzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, X Sauerstoff, MOR^3 , $N-NR^4R^5$, und $N-NHCONR^4R^5$ bedeutet, wobei die Reste \mathbb{R}^3 bis \mathbb{R}^5 die oben angegebene Bedeutung haben und \mathbb{R}^4 und R⁵ auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können; und

Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

5. Epothilonderivat der Formel 5

wobei R = H, C_{1-4} -Alkyl; R^1 , R^2 = H, C_{1-6} -Alkyl, C_{1-6} -Acyl, Benzoyl, C_{1-4} -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6} -Alkoxy-, C_{6} -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X Wasserstoff, C_{1-18} -Alkyl, C_{1-18} -Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl bedeutet und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

6. Epothilonderivat der Formel 6

wobei R = H, C_{1-4} -Alkyl und $R^1 = H$, C_{1-6} -Alkyl, C_{1-6} -Acyl, Benzoyl, C_{1-4} -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6} -Alkoxy-, C_{6} -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl ist; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

7. Epothilonderivat der Formel 7

wobei R = H, C_{1-4} -Alkyl und R^1 , R^2 , R^3 , R^4 = H, C_{1-6} -Alkyl, C_{1-6} -Acyl, Benzoyl, C_{1-4} -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6} -Alkoxy, C_{6} -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um grædkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

8. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 7 gemäß Anspruch 7, dadurch gekennseichnet, daß man Epothilon A, Epothilon B, ein 3-OH-geschütztes Derivat derselben oder ein 7-OH-geschütztes Derivat derselben PCT/EP96/05080

- (a) enzymatisch hydrolysiert, insbesondere mit einer Esterase oder Lipase, oder
- (b) in alkalischem Medium hydrolysiert, insbesondere mit Natriumhydroxid in einem Methanol/Wasser-Gemisch, und das Epothilonderivat der Formel 7 gewinnt und isoliert.
- 9. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 2 gemåß Anspruch 2, dadurch gekennseichnet, daß man ein Epothilonderivat der Formel 7 gemäß Anspruch 7 oder als Produkt des Verfahrens gemäß Anspruch 8
- (a) nach der Yamaguchi-Methode oder
- (b) nach der Corey-Methode oder
- (c) nach der Kellogg-Methode in das Epothilonderivat der Formel 2 umwandelt und dieses Umwandlungsprodukt isoliert.
- 10. Verfahren zur Herstellung von Epothilon A und/oder 12,13-Bisepi-epothilon A, dadurch gekennseichnet, daß man Epothilon C epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persaure.
- 11. Verfahren zur Herstellung von Epothilon B und/oder 12,13-Bisepi-epothilon B, dadurch gekennzeichnet, daß man Epothilon D epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persaure.
- 12. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(\hat{n}).
- 13. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder einer oder

mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT International Search Report	1
CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER PC 5 C070493/04 C070417/06 C070277/24 A61K31/425 C07F7/ C070493/08 A01N43/78 A01N43/99 //(C070493/04,313:0 303:00),(C070493/08,321:00,313:00) CCOURTING TO MATTER CONTROL OF THE CAMPICASON (IPC) or to both Resource classification and IPC	08
PC 6 CO7D CO7F	·
Octumentation marched other than from much documentation to the critical that hack documents are uncluded in the Ocids tax	
Electronic data base compated during the unsmall onal search (name of data base and, where produced, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	Relevant to class No.
C. DOCUMENTS CONSIDERATE. Category Classes of constant, with unbrance, where appropriate, of the relevant passages	
X WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISHE FORSCHUNG MBH)) 27 May 1993 see claims	1-13
Purchar description are based on the constraints of best C. X Process (apply members are best	
* Spend uniquem of good decembers : "I have december published after the or provinty date and set to make the province of the set wheth it left out to the province of the set wheth it left."	mercenad finit data and the appropriate tother a theory underlying the
"A" descript delaying the general mans of the set which at set considerable to led perfection references the processor of the set with the considerable to led perfection references." "B' industrial to the original references the perfect of the set considerable to the set of the set considerable to the set of the set of the set considerable to the set of the se	te daniel sventes est to emplored to derivate a tries date to desire sventes e constant stresses
visit 3 and to critica to published or annual control of control o	7 (1994) 1994 (1994)
Later than the princip date departs	D2. 97
18 February 1997	
Name and making address of the SEA Surveyan Practs Office, P.B. SEES Princedures 3 VL. 12200 MV Reprod. Tel. (-11-79) Sele Sele Sele Sele Sele Sele Sele Sel	

COMBINATION OF 19542986.9 (11/17/95) AND 196394562 (9/25/96)

WO 97/19086

EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATION AND USE

CAD DEZIVATIVES

The present invention concerns general epothilone derivatives and their use for the production of drugs. Especially, the present invention is concerned with the preparation of epothilone derivatives according to the general Formulas 1 to 7 given below, as well as with their use for the production of therapeutic agents and agents for plant protection.

Me
$$\stackrel{S}{\longrightarrow}$$
 $\stackrel{Q}{\longrightarrow}$ \stackrel

7

In the above Formulas 1 to 7, the symbols have the following meanings:

 $\begin{array}{l} R = H, \ C_{14}\text{-alkyl}; \\ R^1, \ R^2, \ R^3, \ R^4, \ R^5 = H, \ C_{14}\text{-alkyl}, \\ C_{14}\text{-trialkylsilyl}, \\ benzyl, \\ phenyl, \\ C_{14}\text{-alkoxy-}, \end{array}$

C₆-alkyl-, hydroxy and halogen-substituted benzyl or phenyl;

also, two of the groups R^1 to R^5 may be combined to form the grouping - $(CH_2)_n$ - with n=1 to 6 and the alkyl or acyl groups contained in the groups are either straight-chain or branched groups;

Y and Z are either identical or different and can stand for hydrogen, halogens, such as F, Cl, Br or I, pseudohalogens, such as -NCO, -NCS or -N₃, OH, O-(C_{1.6})-acyl, O-(C_{1.6})-alkyl, O-benzoyl. Y and Z can also be the O-atom of an epoxide, in which case, epothilone A and B are not claimed, or one of the C-C bonds can form a C=C double bond.

In Formula 3, X generally stands for -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, $-CR^1R^2$ -, where R^1 and R^2 have the meaning given above and $-SiR_2$ -, where R has the meaning given above.

In Formula 4, X stands for oxygen, NOR³, N-NR⁴R⁵, and N-NHCONR⁴R⁵, where the groups R³ to R⁵ have the meaning given above.

In Formula 5, X stands for hydrogen, C₁₋₁₈-alkyl, C₁₋₁₈-acyl, benzyl, benzoyl and cinnamoyl.

With regard to epothilone A and B, let us refer to DE-A-41 38 042. Compounds according to general Formula 1 are accessible starting from epothilone A and B, as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by opening the 12,13-epoxide. When hydrogen halides are used for this purpose in a preferred nonaqueous solvent, the halohydrins X = Hal, Y = OH and Y = OH, Y = Hal are obtained. Protonic acids, for example, toluenesulfonic acid and trifluoroacetic acid, lead to 12,13-diols in the presence of water and then these are

acylated subsequently according to standard methods (for example, with carboxylic acid anhydrides and pyridine or triethylamine/DMAP) or are alkylated (alkyl halides and silver oxide). For this purpose, the 3- and 7-hydroxy groups can be protected temporarily as the formate (cleaved with NH₃/MeOH) or p-methoxybenzyl ether (cleaved with DDQ).

Compounds according to general Formula 2 are obtainable from epothilone A and B as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by reduction, for example, with NaBH, in methanol. If the 3-OH and/or 7-OH groups are protected reversibly during this process, after acylation or alkylation, and removal of the protecting groups, 5-O-monosubstituted, 3,5- or 5,7-O-disubstituted derivatives according to general Formula 2 can be obtained.

Reactions of epothilone A and B with bifunctional electrophilic reagents, such as (thio)phosgene, (thio)carbonyldimidazole [sic], thionyl chloride or dialkylsilyl dichlorides or bistriflates give compounds having general Formula 3. The bases used as aids here can be pyridine, trialkylamine, optionally together with DMAP or 2,6-lutidine in an aprotic solvent. The 3,7-acetals having general Formula 3 are formed by transacetalization, for example, of dimethylacetals, in the presence of an acidic catalyst.

Compounds according to general Formula 4, obtained from epothilone A and B or from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by ozonolysis and reductive processing, for example, with dimethyl sulfide. The C-16 ketones can then be converted to the oximes, hydrazones or semicarbazones according to standard methods known to the expert in the field. Furthermore, they are converted into C-16/C-17 olefins by the Wittig, Wittig-Horner, Julia or Petersen olefination method.

The 16-hydroxy derivatives according to general Formula 5 are obtainable by reduction of the C-16 keto group, for example, with aluminum hydride or borohydride. When the 3-OH and 7-OH groups are protected correspondingly, they can be acylated or alkylated selectively. The liberation of the 3-OH- and 7-OH groups is done, for example, with NH₂/MeOH in the case of O-formyl and with DDQ in the case of O-p-methoxybenzyl.

The compounds having general Formula 6 are obtained from derivatives of epothilone A and B in which the 7-OH group is protected by acyl or ether groups, in which the 3-OH group is, for example, formylated, mesylated or tosylated and then eliminated by treatment with a base, for example, DBU. The 7-OH group can be liberated as described above.

Compounds having general Formula 7 are obtained from epothilone A and B or from their 3-OH- and 7-OH-protected derivatives by basic hydrolysis, for example, with NaOH in MeOH or MeOH/water. Preferably, the compounds having general Formula 7 are obtained from epothilone A or B or from their 3-OH- or 7-OH-protected derivatives by enzymatic hydrolysis, preferably with esterases or lipases. The carboxyl group can be converted into the ester by alkylation with diazoalkanes after protection of the 19-OH group.

Furthermore, compounds having Formula 7 can be converted into the compound having Formula 2 by lactonization according to the methods of Yamaguchi (trichlorobenzoyl chloride/DMAP), Corey (aldrithiol/triphenylphosphine) or Kellogg (omega-bromic acid/cesium carbonate). The corresponding methods can be found in Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; and Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

In order to prepare the compounds according to the invention, one can also start from epothilone C or D, and the derivatization methods described above can be used for derivatization here, too. The 12,13-double bond can be hydrogenated selectively, for example, catalytically or with diimine; or it can be epoxidized, for example, with dimethyldioxiran or a peracid; or it can be converted into the dihalides, dipseudohalides or diazides.

Furthermore, the invention is concerned with means for plant protection in agriculture, forestry and/or gardening, consisting of one or several of the epothilone derivatives described above or consisting of one or several of the epothilone derivatives described above in addition to one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).

Finally, the invention is concerned with therapeutic agents, consisting of one or several of the compounds listed above or of one or several of the compounds listed above in addition to

one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s). These agents can exhibit especially cytotoxic activities and/or cause immunesuppression and/or can be used for combatting malignant tumors, but they can especially preferably be used as cytostatic agents.

The invention is explained further and described by the description of a few selected practical examples.

Examples

Translator's note: In the infrared spectra in the examples, the general English abbreviations are used, s, m, w, vs, b, etc., except for Sch = shoulder and ny = ν (nu) Also, the abbreviation lg stands for log.

Example 1:

Compound 1a

20 mg (0.041 mmole) of epothilone A is dissolved in 1 mL of acetone, with 50 μ L (0.649 mmole) of trifluoroacetic acid is added and the mixture is stirred overnight at 50°C. For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M pH 7 phosphate buffer and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer-chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: 4 mg (19%) isomer I 4 mg (19%) isomer II

Isomer I

R. (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

```
IR (Film):

ny = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734

(vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256

(s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m,
Sch), 884 (w), 735 (w) cm<sup>-1</sup>.
```

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 [M-H₂O]⁺), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

High resolution: CaHaOaNS ca

calculated:

493.2498 for [M-H₂O]*

found:

493.2478

Isomer II

R. (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.22

IR (Film): ny = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm⁻¹.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 [M-H₂O]⁺), 394 (12), 306 (46), 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

High resolution: C26H39O6NS

calculated:

493.2498 for [M-H₂O]*

found:

493.2475

Example 2:

Compound 1b

Epothilone A, 55 mg (0.111 mmole), is dissolved in 0.5 mL of tetrahydrofuran, 0.S[sic] mL of 1 N hydrochloric acid is added and the mixture is stirred for 30 minutes at room temperature. Then 1 N phosphate buffer of pH 7 is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/methanol, 90:10). Yield: 19 mg (32%).

R. (dichloromethane/methanol, 90:10): 0.46

3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 IR (Film): (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M⁺]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

529.2265 for [M*], calculated: High resolution: C26H40O6CINS

529,2280 found:

Example 3:

Compound 1c

12-Chloro-13-hydroxy-epothilone A (1b), 25 mg (0.047 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloromethane, and then 29 mg (0.235 mmole) of dimethylaminopyridine, 151 μ L (1.081 mmole) of triethylamine and 20 μ L (0.517 mmole) of 98% formic acid are added. The reaction mixture is cooled with ice/sodium chloride. After reaching -15°C, 40 μL (0.423 mmole) of acetic anhydride is added to the reaction mixture, followed by stirring for 70 minutes at -15°C. Since the thin-layer chromatogram did not show complete conversion, another 6 mg (0.047 mmole) of dimethylaminopyridine, 7 µL (0.047 mmole) of triethylamine, 2 µL of 98% formic scid (0.047 mmole) and 4 µL (0.047 mmole) of acetic anhydride are added to the reaction mixture, followed by stirring for 60 minutes. For work-up, the reaction mixture is heated to room temperature, 1 M phosphate buffer with pH 7 is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 90:10). Yield: 5 mg (18%).

R. (Dichloromethane/acetone, 90-10): 0.67

IR (Film): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M⁺]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

High resolution: C₂₀H₄₀O₉NSCl calculation: 613.2112 for [M⁺]

found: 613.2131

Example 4:

Compound 1d

10 mg (0.020 mmole) of epothilone B is dissolved in 0.5 mL of tetrahydrofuran, then 0.5 mL of 1 N hydrochloric acid is added and the mixture stirred for 30 minutes at room temperature. Then 1 M phosphate buffer at pH 7 is added and the aqueous phase is extracted 4 times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from solvent. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: 1 mg (9%)

R, (Dichloromethane/acetone, 85:15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (t) = 543 (3 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

High resolution: C₂₇H₄₂O₆NSCl calculated: 543.2421 for [M⁺]

found: 543.2405

Example 5:

Compound 2a

Epothilone A, 100 mg (0.203 mmole), is dissolved in 4 mL of tetrahydrofuran/1 M phosphate buffer, pH 7 (1:1) and sodium borohydride (150 mg = 3.965 mmole) is added until the thin-layer chromatogram shows that the starting material reacted completely. Then the mixture is diluted with 1 M phosphate buffer, pH 7 and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done by silica gel chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 95:5 - in 5 steps to dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: (20%)

R. (Dichloromethane/acetone, 75:25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M*]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

High resolution: C₂₀H₄₁O₆NS calculated: 495.2655 for [M⁺] found: 495.2623

Example 6:

Compound 3a-d (a-d are stereoisomers)

Epothilone, 100 mg (0.203 mmole) is dissolved in 3 mL of pyridine, with 50 μ L (0.686 mmole) of thionyl chloride added and the mixture is stirred for 15 minutes at room tempera-

ture. Then, 1 M phosphate buffer, pH 7, is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product and separation of the four stereoisomers 3a-d is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Compound 3a

Yield: 4 mg (12%)

R, (toluene/methanol, 90:10): 0.50

IR (Film):

ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs),

1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s,

Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957

(s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch)

cm⁻¹

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M⁺]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

High resolution: C₂₆H₃₇O₇NS₂ calculated: 539.2011 for [M⁺]

Compound 3b

Yield: 14 mg (13%)

R. (toluene/methanol, 90:10): 0.44

IR (Film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s),
1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m,
Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076
(w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br,
Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm⁻¹

<u>uv (Methanol):</u> lambda_{max} (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M⁺]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

High resolution: C₂₆H₃₇O₇NS₂ calculated: 539.2011 for [M⁺]

found: 539.1998

Compound 3c
Yield: 4 mg (4%)

R. (toluene/methanol, 90:10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (*) = 539 (51 [M⁺]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

High resolution: C₂₀H₂₇O₇NS₂ calculated: 539.2011 for [M⁺] found: 539.2001

C mpound 3d

Yield: 1 mg (1%)

R. (toluene/methanol, 90:10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M⁺]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

High resolution: C₂₆H₃₇O₇N₂ calculated: 539.2011 for [M⁺]

found: 539.1997

Example 7:

Compound 4a

Epothilone A, 10 mg (0.020 mmole), is dissolved in 2 mL of dichloromethane, cooled to -70°C and then treated with ozone for 5 minutes until a weak blue coloration develops. The resulting reaction mixture is then treated with 0.5 mL of dimethyl sulfide and heated to room temperature. In the work-up, the solvent is removed from the reaction mixture and finally the product is purified with preparative layer chromatography (solvent dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5).

Yield: 5 mg (64%)

R. (Dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5): 0.61

IR (Film): ny = 3468 (s. br. Sch), 2947 (s. br. Sch),
1734 (vs. Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267
(w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm⁻¹.

<u>UV (Methanol):</u> $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M*]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

398.2305 for [M⁺] High resolution: C21H34O7 calculated:

398.2295 found:

Example 8:

Compound 6a

3,7-Di-O-formyl-epothilone A, 10 mg (0.018 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloromethane, 27 μ L (0.180 mmole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) is added and the mixture stirred at room temperature for 60 minutes.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. After elimination of the solvent, the resulting crude product is dissolved in 1 mL of methanol, treated with 200 μ L of ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH₂/mL of methanol) and stirred overnight at room temperature. For work-up, the solvent is removed in vacuum.

Yield: 4 mg (22%)

R. (Dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch), ny IR (Film): 1717 (vs. Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch), 1370 (m, SCh), 1267 (s, br, Sch), 1179 (s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm-1

UV (Methanol): lambdamax (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV); m/e (%) = 475 (28 [M⁺]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26) .

High resolution: C₂₆H₃₇O₅NS calculated: 475.2392 for [M⁺]

found: 475.2384

Example 9:

Compound 6b

3,7-Di-O-formyl-epothilone A, 50 mg (0.091 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloroethane, 2 mL (0.013 mole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) is added and the mixture stirred for 12 hours at 90°C.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent removed. The purification of the crude product, which consists of two compounds, is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane-/acetone, 90:10).

Yield: 7 mg (15%)

Substance code

R. (Dichloromethane/acetone, 90:10): 0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (*) = 503 (68 [M*]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

503.2342 for [M+] High resolution: CnH110eNS calculated:

found:

503.2303

Example 10:

Compound 6c

3,7-Di-O-acetyl-epothilone, 5 mg (0.009 mmole), is dissolved in 1 mL of methanol, 150 μ L of an ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH/mL of methanol) is added and the mixture stirred overnight at 50°C.

For work-up, the solvent is removed in vacuum and the crude product is purified with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (67%)

R. (Dichloromethane/acetone, 90:10): 0.55

2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (Film): IR (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M⁺]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

517.2498 for [M+] calculated: High resolution: C1-H1-O.NS 517.2492 found

Example 11:

Compound 7a

Epothilone, 20 mg (0.041 mmole), is dissolved in 0.5 mL of methanol, 0.5 mL of 1 N sodium hydroxide is added and the mixture stirred for 5 minutes at room temperature.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography. (Solvent: dichloromethane/methanol, 85:15).

Yield: 11 mg (52%)

R. (Dichloromethane/methanol, 85:15): 0.92

3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch), IR (Film): ny 1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch), 1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm-1

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M⁺]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

High resolution: C22H27O4NS

calculated:

423.2443 for [M⁺]

found:

423.2410

Example 12:

Compound 7b

5 mg (0.009 mmole) of 7-O-acetyl-epothilone is dissolved in 1 mL of methanol, 200 μ L of an ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH,/mL of methanol) is added and the mixture is stirred for 2 days at 50°C. For work-up, the solvent is removed in vacuum. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (59%)

R. (Dichloromethane/methanol, 90:10): 0.63

3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 IR (Film): ny (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm⁻¹

<u>UV (Methanol)</u>: lambda_{max} (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M⁺]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

567.2866 for [M⁺] calculated: High resolution: C20H45O2NS

567.2849 found:

Example 13:

Epothilone A, 50 mg, is dissolved in 20 μ L of dimethyl sulfoxide and diluted with 30 mL of phosphate buffer (pH 7.1, 30 mM). After addition of 5 mg of pig liver esterase (Boehringer Mannheim), the mixture is stirred for 2 days at 30°C. It is acidified with 2 N HCl to pH 5 and the epothilonic acid 7 is extracted with ethyl acetate. The organic phase is dried with sodium sulfate and evaporated to dryness in vacuum. Yield 48 mg (96%).

Example 14:

Epothilonic acid 7, 48 mg, is dissolved in 6 mL of absolute THF and 40 μ L of triethylamine and 16 μ L of 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride are added under stirring. After 15 minutes, the precipitate is filtered off and, within 15 minutes, under rapid stirring, it is added dropwise to a boiling solution of 20 mg of 4-dimethylaminopyridine in 200 mL of absolute toluene. After another 10 minutes, the mixture is evaporated in vacuum and the residue is partitioned between ethyl acetate/citrate buffer (pH 4). The evaporation residue of the organic phase gives 15 mg of epothilone A after preparative HPLC separation.

Example 15:

Epothilone C and D as starting compounds

A. Production stock and culture conditions corresponding to the basic epothilone patent

B. Production with DSM 6773

A culture, 75 L, is raised as described in the basic patent and was used for inoculating a production fermenter with 700 L of production medium consisting of 0.8% starch, 0.2% glucose, 0.2% soy meal, 0.2% yeast extract, 0.1% CaCl₂·2H₂O, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 8 mg/L of Fe-EDTA, pH = 7.4 and optionally 15 L of adsorbent resin Amberlite XAD-16. The fermentation takes 7-10 days at 30°C, aeration with 2 m³ of air/hour. The pO₂ is kept at 30% by adjusting the rate of rotation.

C. Isolation

The adsorber resin is separated from the culture with a 0.7 m², 100 mesh process filter and the polar accompanying substance is removed from it by washing with 3 bed volumes of water/methanol 2:1. Upon elution with 4 bed volumes of methanol, a crude extract is obtained, which is evaporated in vacuum until the appearance of the water phase. This is extracted three times with the same volume of ethyl acetate. Evaporation of the organic phase gives 240 g of crude extract, which is partitioned between methanol and heptane in order to remove any lipophilic accompanying substances. Thus, 180 g of raffinate is obtained from the methanol phase by evaporation in vacuum; this is fractionated into three portions on Sephadex LH-20 (volume 20 x 100 cm, 20 mL/min methanol). The epothilones are contained in the fraction eluted with a retention time of 240-300 minutes, a total amount of 72 g being obtained. To separate the epothilones, the product is chromatographed in three portions on Lichrosorb RP-18 (15 µm, column 10 x 40 cm, solvent 180 mL/minute methanol/water 65:35). After epothilone A and B, epothilone C is eluted with $R_t = 90-95$ minutes and epothilone D with 100-110 minutes and after evaporation in vacuum, they are obtained as colorless oils, each in an amount of 0.3 g.

D. Physical properties

Epothilone C R = HEpothilone D $R = CH_3$

Epothilone C

C26H39NO5S [477]

ESI-MS: (positive ions): 478.5 for [M+H]+

¹H and ¹³C see NMR table

TLC: $R_t = 0.82$

TLC-aluminum foil 60 F 254 Merck, solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV extinguishing at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent,

blue-gray coloration upon heating to 120°C.

HPLC: R: 11.5 min

Column: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm

Solvent: methanol/water = 65:35

Flow rate: 1 mL/min
Detection: diode array

Epothilone D

C₂₇H₄₁NO₅S [491]

ESI-MS: (positive ions): 492.5 for $[M+H]^+$

¹H and ¹³C, see NMR table

TLC: $R_f = 0.82$

TLC-aluminum foil 60 F 254 Merck, solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV extinguishing at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent,

blue-gray coloration upon heating to 120°C.

HPLC: R_t = 15.3 min

Column: Nucleosii 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm

Solvent: methanol/water = 65:35

Flow rate: 1 mL/min
Detection: diode array

WO 97/19086 PCT/EP96/05080

Table: ¹H and ¹³C-NMR data of epothilone C and epothilone D in [D₆ DMSO at 300 MHz

Epothilone C			Epothilone D)		
H-Atom	გ (ppa)	C-Atom	გ (p p m)	ة (يقو م)	C-Atom	ö (ppm)
<u>_</u>		1	170.3		1	170.1
	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Ha	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8
2-НЪ	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3 - H	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
3 - OH 5 - H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-H	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3
7-0H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9
8 - H	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Ha		11	27.6	1.38	11	31.8*
9 - HD	1.40	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-HA	1.15° 1.35°	13	133.1	1.35*	13	120.3
10-Hb	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-HE	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
11-Hb	5.38**	16	137.3		16	137.2
12-H		17	119.1	5.08	17	119.2
13-H	5.44**	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Ha	2.35	19	117.7	2.65	19	117.7
14-Hb	2.70	20	164.2	5.29	20	164.3
15-H	5.27	21	18.8	6.51	21	18.9
17-H	6.50	22	20.8	7.35	22	19.7
19-H	7.35		22.6	2.65	23	22.5
21-K,	2.65	23	16.7	0.90	24	16.4
22-H ₁	0.94	24	18.4	1.19	25	18.4
23-H,	1.21	25		1.07		22.9
24-H,	1.06	27	14.3	0.91	27	14.1
25-H,	0.90			1.63		
26-H,				2.11		
27-H,	2.10			4.11		

^{*, **} Assignment interchangeable.

Example 15: [This should be Example 16]

Epothilone A and 12,13-bisepi-epothilone A from epothilone C

Epothilone A, 50 mg, is dissolved in 1.5 mL of acetone and 1.5 mL of a 0.07 molar solution of dimethyldioxiran in acetone is added. After standing for 6 hours at room temperature, it is evaporated in vacuum and separated by preparative HPLC on silica gel (solvent: methyltert.butyl ether/petroleum ether/methanol 33:66:1).

Yield:

25 mg epothilone A, R_t = 3.5 min (analyt. HPLC, 7 μ m, column 4 x 250 mm, solvent see above, flow rate 1.5 mL/min)

and .

20 mg of 12,13-bisepi-epothilone A, R, = 3.7 min, ESI-MS (positive ions)

 $m/z = 494 [M+H]^+$

¹H-NMR in [D₄] methanol, selected signals:

 $\delta = 4.32$ (3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H), 3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69 (17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).

12,13-bisepi-epothilone A R = H

Patent Claims

1. Epothilone derivative having Formula 1

1

where R = H, C_{14} -alkyl; R^1 , $R^2 = H$, C_{14} -alkyl, C_{14} -acyl, benzoyl, C_{14} -trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{14} -alkoxy, C_{6} -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and the alkyl and acyl groups in these groups are straight-chain or branched groups and Y and Z are either the same or different and stand for hydrogen, halogen, pseudohalogen, OH, $O-(C_{14})$ -acyl, $O-(C_{14}$ -alkyl or O-benzoyl or together form the O-atom of an epoxide or one of the C-C bonds form a C=C double bond, where epothilone A and B are excepted.

2. Epothilone derivative having formula 2

where R = H, C_{14} -alkyl; R^1 , R^2 , $R^3 = H$, C_{16} -alkyl, C_{16} -acyl, benzoyl, C_{14} -trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{16} -alkoxy-, C_{6} -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups and Y and Z have the meaning according to Claim 1.

3. Epothilone derivative according to formula 3

3

where R = H, $C_{1.4}$ -alkyl; R^1 , $R^2 = H$, $C_{1.4}$ -alkyl, $C_{1.4}$ -acyl, benzoyl, $C_{1.4}$ -trialkylsilyl, benzyl, phenyl, $C_{1.4}$ -alkoxy-, C_{6} -alkyl-, hydroxy-, and halogen-substituted benzyl and phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups and X stands generally for -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, $-CR^1R^2$ - and $-SiR_2$ -, where R, R¹ and R² have the meaning given above and R¹ and R² together can also form an alkylene group with 2 to 6 carbon atoms; and Y and Z have the meaning according to Claim 1.

4. Epothilone derivative according to formula 4

where R = H, $C_{1.4}$ -alkyl; R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , $R^5 = H$, $C_{1.4}$ -alkyl, $C_{1.5}$ -acyl, benzoyl, $C_{1.4}$ -trialkylsilyl, benzyl, phenyl, $C_{1.6}$ -alkoxy-, C_6 -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups; X stands for oxygen, NOR³, N-NR⁴R⁵, and N-NHCONR⁴R⁵, where the groups R^3 to R^5 have the meaning given above and R^4 and R^5 together can form an alkylene group with 2 to 6 carbon atoms; and

Y and Z have the meaning according to Claim 1.

5. Epothilone derivative having formula 5

where R = H, $C_{1:4}$ -alkyl; R^1 , $R^2 = H$, $C_{1:4}$ -alkyl, $C_{1:6}$ -acyl, benzoyl, $C_{1:4}$ -trialkylsilyl, benzyl, phenyl, $C_{1:4}$ -alkoxy-, C_{6} -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups and X stands for hydrogen, $C_{1:16}$ -alkyl, $C_{1:16}$ -acyl, benzyl, benzoyl and cinnamoyl and Y and Z have the meaning according to Claim 1.

6. Epothilone derivative according to formula 6

in which R = H, C_{14} -alkyl and $R^1 = H$, C_{14} -alkyl, C_{14} -acyl, benzoyl, C_{14} -trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{14} -alkoxy-, C_{6} -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups; and Y and Z have the meaning given in Claim 1.

7. Epothilone derivative according to formula 7

7

in which R = H, $C_{1:4}$ -alkyl; and R^1 , R^2 , R^3 , $R^4 = H$, $C_{1:4}$ -alkyl, $C_{1:4}$ -acyl, benzyl, $C_{1:4}$ -trialkylsilyl, benzyl, phenyl, $C_{1:4}$ -alkoxy-, C_6 -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups; and Y and Z have the meaning according to Claim 1.

8. Method for the preparation of an epothilone derivative having formula 7, according to Claim 7, characterized by the fact that epothilone A, epothilone B, a 3-OH-protected derivative of these or a 7-OH-protected derivative of these is

- (a) hydrolyzed enzymatically, especially with an esterase or lipase, or
- (b) is hydrolyzed in an alkaline medium, especially with sodium hydroxide, in a methanol/water mixture, and the epothilone derivative having formula 7 is obtained and isolated.
- Method for the preparation of an epothilone derivative having formula 2, according to Claim 2, characterized by the fact that an epothilone derivative having formula 7, according to Claim 7, or as product of the method according to Claim 8, is converted into the epothilone derivative having formula 2 according to
- (a) the Yamaguchi method or
- (b) the Corey method or
- (c) the Kellogg method and then this conversion product is isolated.
- 10. Method for the preparation of epothilone A and/or 12, 13-bisepi-epothilone A, characterized by the fact that epothilone C is epoxidized, especially with dimethyl dioxiran or a peracid.
- 11. Method for the preparation of epothilone B and/or 12,13-bisepi-epothilone B, characterized by the fact that epothilone D is epoxidized, especially with dimethyldioxiran or a peracid.
- 12. Means for plant protection in agriculture and forestry and/or in gardening, consisting of one or several of the compounds according to one of the previous Claims, or according to one or several of these compounds together with one or several usual carrier(s) and/or diluent(s).
- 13. Therapeutic agent, especially for use as cytostatic agent, consisting of one or several of the compounds according to one or several of Claims 1 to 7, or one or several compounds according to one or several of Claims 1 to 7 together with one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).